

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Dominika Kopalová

Cirkulující nádorová DNA u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem

Circulating tumor DNA in advanced colorectal carcinoma patients

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lucie Benešová, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Cirkulující nádorová DNA u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lucie Benešové, Ph.D. a že jsem v seznamu literatury na konci práce uvedla veškeré použité informační zdroje.

V Praze, dne.....

.....

Dominika Kopalová

Poděkování

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce RNDr. Lucii Benešové, Ph.D. za čas, ochotu a cenné rady, které mi věnovala při zpracování této práce. Také děkuji své rodině a přátelům, kteří mě v průběhu psaní podporovali.

Abstrakt

Kolorektální karcinom (CRC) je celosvětově jedno z nejčastějších nádorových onemocnění. U přibližně 50 % pacientů je diagnostikován v pokročilém stádiu, kdy i po odstranění všech nádorových ložisek hrozí vysoké riziko jejich návratu, což výrazně zhoršuje prognózu těchto pacientů. CRC, stejně jako většina ostatních solidních nádorů, uvolňuje do krevního oběhu fragmenty DNA tzv. cirkulující nádorovou DNA (ctDNA). Vyšetření ctDNA je novým nástrojem pro průběžné monitorování aktuální nádorové masy a pro sledování reakce na léčbu. Díky jeho minimální invazivitě a vysoké specifitě je např. vhodný k dlouhodobému pooperačnímu sledování pacientů s CRC, v rámci kterého lze zhodnotit radikalitu operace a časně zachytit nová nádorová ložiska. V této práci se zaměřuji na původ a mechanismus uvolňování ctDNA do krevního řečiště, její vlastnosti a možnosti klinického využití u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem.

Klíčová slova: cirkulující nádorová DNA, ctDNA, pokročilý kolorektální karcinom, mCRC, marker

Abstract

Colorectal carcinoma (CRC) is worldwide known as one of the most often tumor diseases. Approximately 50 % of patients are diagnosed with advanced stage of CRC and moreover even after removing all of the tumor bearings, there is high risk of its recurrence. As most of others solid tumors the CRC also releases fragments of DNA also known as the circulating tumor DNA (ctDNA). The ctDNA analysis is a new tool for monitoring continuous tumor burden and for observing treatment response. Due to its minimal invasivity and high specificity is suitable for instance for long period postoperative follow-up of patients with CRC. Within the long period follow-up process an evaluation radicality of operation is conducted as well as an early detection of new tumor foci. This thesis focus on an origin and releasing mechanism of ctDNA into bloodstream, its features and clinical utility options for patients with an advanced colorectal carcinoma.

Key words: circulating tumor DNA, ctDNA, advanced colorectal carcinoma, mCRC, marker

Seznam zkratek:

APC	Adenomatous Polyposis Coli	
BEAMing	Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics	
CA 19–9	Cancer Antigen 19–9	tumorový antigen 19–9
CAPPSeq	CAnceR Personalized Profiling by deep Sequencing	
CEA	Carcinoembryonic Antigen	karcinoembryonální antigen
CfDNA	Circulating Cell–free DNA	cirkulující bezbuněčná DNA
CRC	Colorectal Cancer	kolorektální karcinom
CT	Computed Tomography	výpočetní tomografie
CTC	Circulating Tumor Cells	cirkulující nádorové buňky
CtDNA	Circulating Tumor DNA	cirkulující nádorová DNA
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype	hypermetylace v CpG ostrůvcích promotorů genů
CIN	Chromosomal Instability	chromozomální nestabilita
DNA	Deoxyribonucleic Acid	deoxyribonukleová kyselina
dPCR	Digital Polymerase Chain Reaction	digitální polymerázová řetězová reakce
ddPCR	Droplet Digital PCR	
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	receptor pro epidermální růstový faktor
ERBB2	Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2	
FAP	Familial Adenomatous polyposis	familiární adenomatózní polypóza
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded	(tkáň) fixovaná formalínem, zalitá do parafinu
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer	hereditární nepolypózní forma CRC
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog	
mCRC	Metastatic Colorectal Cancer	metastatický kolorektální karcinom
MRI	Magnetic Resonance Imaging	magnetická rezonance
MSI	Microsatellite Instability	mikrosatelitová nestabilita
NGS	Next Generation Sequencing	sekvenování nové generace
NPY	Neuropeptide Y	neuropeptid Y
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog	
OS	Overall Survival	celkové přežití
PCR	Polymerase Chain Reaction	polymerázová řetězová reakce
PET/CT	Positron Emission Tomography/ Computed Tomography	pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie
qPCR	Quantitative PCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RNA	Ribonucleic Acid	ribonukleová kyselina
Safe-SeqS	Safe–Sequencing System	
TP 53	Tumor Protein 53	tumorový protein 53
UI	Unique Identifier	unikátní identifikátor
WIF1	WNT Inhibitory Factor 1	

Obsah:

1. Úvod	1
2. Kolorektální karcinom.....	2
2.1 Výskyt a etiologie.....	2
2.2 Patogeneze.....	4
2.2.1 Genetické a molekulární změny	4
2.3 Metastatický kolorektální karcinom (mCRC)	7
2.3.1 Charakteristika a prognóza mCRC	7
2.3.2 Diagnostika mCRC.....	8
3. Cirkulující nádorová DNA	9
3.1 Historie ctDNA.....	9
3.2 Původ a mechanismus uvolňování do krevního řečiště.....	9
3.2.1 Pasivní mechanismus.....	9
3.2.2 Aktivní mechanismus	11
3.3 Míra fragmentace ctDNA	11
3.4 Vyšetření ctDNA	12
3.4.1 Příprava vzorků a izolace ctDNA.....	12
3.4.2 Analýza ctDNA	13
3.5 CtDNA u pokročilého kolorektálního karcinomu a její klinické využití	14
3.5.1 Záchyt.....	14
3.5.2 Dlouhodobé pooperační sledování pacientů.....	14
3.5.3 Radikalita operace	15
3.5.4 Sledování odpovědi na léčbu.....	15
3.5.5 Vznik rezistence na léčbu	16
3.5.6 Prognostický marker.....	16
4. Závěr.....	17
5. Seznam literatury.....	18

1. Úvod

Nádorové onemocnění je celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. Vzniká na základě nekontrolovaného množení buněk, ze kterých se tvoří nádorová tkáň. Transformace zdravých buněk v nádorové probíhá postupně a dochází k mnoha histologickým, morfologickým a genetickým změnám (Frank 2007). Nádorové buňky se liší od zdravých buněk soběstačností mj. v produkci růstových faktorů, rezistencí vůči apoptóze, neschopností odpovídat na signály k zastavení růstu, stimulací angiogeneze k prokrvení nádoru, teoreticky neomezeným replikačním potenciálem a schopností šířit se do vzdálených tkání a metastazovat (Hanahan 2000).

Kolorektální karcinom je maligní nádor postihující tlusté střevo a konečník. Celosvětově se řadí na třetí místo ve výskytu lidských malignit a zároveň je to nejčastější typ rakoviny v rámci gastrointestinálního traktu. Incidence kolorektálního karcinomu po celém světě stále stoupá a Česká republika není výjimkou (Torre 2015).

Prognóza pacientů s kolorektálním karcinomem závisí na stádiu, ve kterém je toto onemocnění diagnostikováno. Pacienti s CRC odhaleným v časném stádiu, nejčastěji v rámci screeningových metod, mají po chirurgickém odstranění tumoru šanci na úplné vyléčení. Nicméně až v 50 % případů jsou diagnostikována pozdní stadia, kdy jsou přítomné buď lokální, nebo vzdálené metastázy. I zde je primární snahou chirurgické odstranění veškeré nádorové hmoty včetně metastáz, avšak riziko návratu onemocnění je vysoké. Proto je klíčovým faktorem dlouhodobé sledování pacienta pro raný záchyt nových nádorových ložisek a jejich včasné odstranění (Brenner 2014). Pro tento účel jsou v současné době využívána biochemická vyšetření tumorových markerů a zobrazovací metody (Vukobrat-Bijedic 2013). Oba tyto přístupy mají však svá omezení, a proto se hledají nové markery, včetně molekulárně–biologických. Tyto markery by měly sloužit především k dlouhodobému pooperačnímu sledování pacienta a jako pomoc při volbě vhodné léčby. Jedním z takových markerů je ctDNA, což jsou krátké fragmenty DNA volně se vyskytující v krevním oběhu, které jsou uvolňovány nádorovou tkání a jejichž hladina dynamicky odráží nárůst či úbytek této tkáně (Anker 2016).

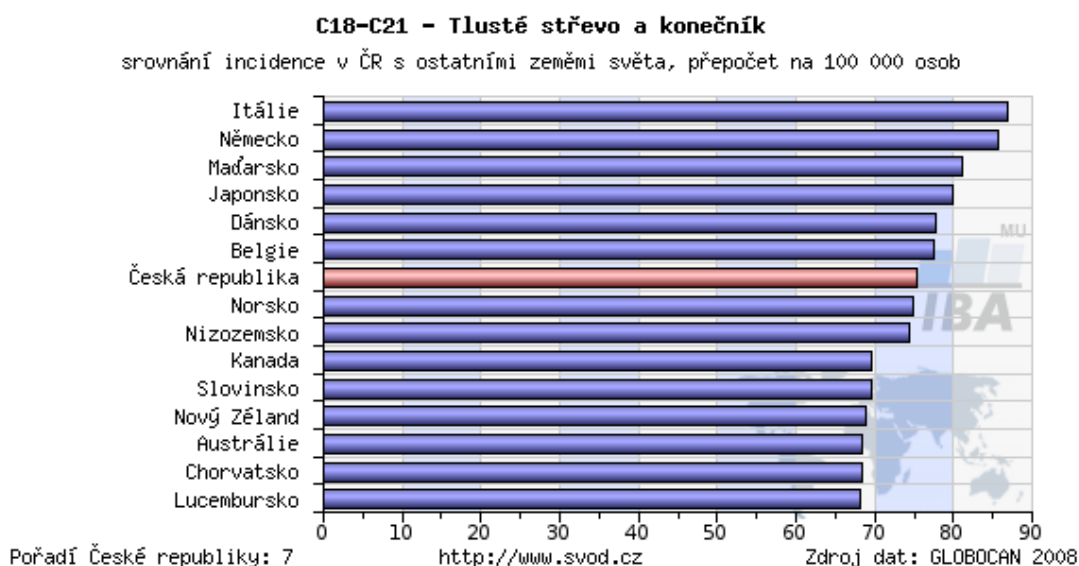
Cílem této práce je shrnout nejnovější poznatky o volné cirkulující DNA u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem. V práci se zabývám zejména původem a mechanismem uvolňování ctDNA do krevního oběhu, metodikou její detekce a využitím v klinické praxi při monitorování dynamiky nádorového onemocnění a sledování reakce na probíhající léčbu.

2. Kolorektální karcinom

2.1 Výskyt a etiologie

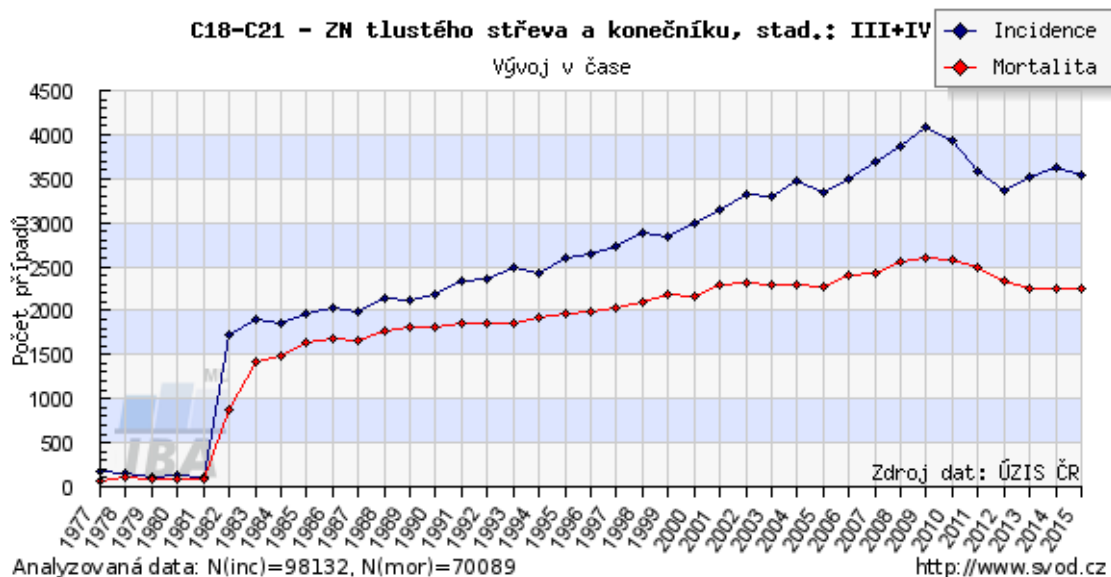
CRC je třetím nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním na světě a druhým v Evropě. V roce 2012 bylo po celém světě diagnostikováno téměř 1,4 milionů nových případů a zemřelo okolo 700 000 pacientů. Celková incidence (nově diagnostikované případy onemocnění za rok) a mortalita (úmrtnost) je vyšší u mužů než u žen. U mužů je CRC třetí nejčastější typ rakoviny, po rakovině prostaty a plic. U žen je CRC druhým nejčastějším typem rakoviny, kdy se na první místo řadí rakovina prsu (Torre 2015).

Rozložení četnosti výskytu kolorektálního karcinomu se liší v různých oblastech světa. Tuto situaci popisuje graf na obrázku číslo 1, ve kterém vidíme, že Česká republika ve srovnání s ostatními zeměmi světa zaujímá v incidenci CRC sedmé místo (www.svod.cz).



Obr. 1 Srovnání incidence rakoviny tlustého střeva a konečníku v ČR s ostatními zeměmi světa (www.svod.cz)

Incidence CRC stále narůstá, zatímco mortalita v posledních letech stagnuje, a to díky zlepšujícím se diagnostickým a léčebným postupům. V roce 2015 byla incidence v ČR 8000 případů a odhad pro rok 2020 je 9 368 případů, z čehož pokročilá stádia onemocnění (III a IV) představují téměř polovinu všech případů (obr. 2).



Obr. 2 Časový vývoj incidence a mortality stádií III a IV kolorektálního karcinomu v ČR (www.svod.cz)

Stádium III – postiženy regionální lymfatické uzliny, vzdálené metastázy nepřítomny, stádium IV – přítomny vzdálené metastázy (www.onkologiecs.cz).

Rizikové faktory pro vznik CRC můžeme rozdělit na vnější a vnitřní. K vnějším faktorům patří zejména kouření cigaret, nadměrná konzumace alkoholu, konzumace červeného masa a živočišných tuků a strava chudá na vlákninu (Kashida 2006). Tyto rizikové faktory lze minimalizovat primární prevencí, do které spadá zdravá strava bohatá na živiny, dostatek pohybové aktivity, nekuřáctví a omezení alkoholu (Chan 2010).

Vnitřní faktory hrají při etiologii CRC menší roli a zahrnují především nespecifické střevní záněty (např. ulcerózní kolitidu) a rodinnou anamnézu. Nejvíce ohrožení jsou příbuzní prvního stupně, u kterých je riziko výskytu onemocnění nejméně 2x vyšší v závislosti na počtu postižených příbuzných a na věku, ve kterém jim byl CRC diagnostikován. U takových osob je doporučena sekundární prevence v podobě screeningu (Taylor 2010; Jess 2012).

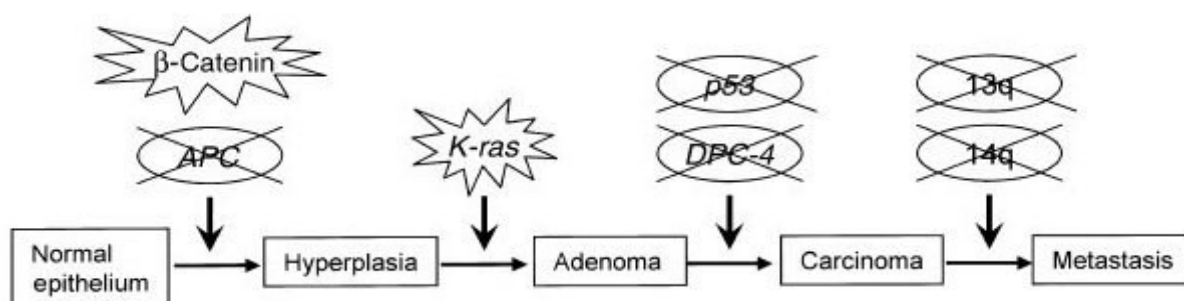
2.2 Patogeneze

2.2.1 Genetické a molekulární změny

Z molekulárně–genetického hlediska je kolorektální karcinom heterogenní onemocnění. Existují tři nejvýznamnější molekulární dráhy, které vedou ke vzniku zhoubného nádoru. Jsou to chromozomální nestabilita (CIN), mikrosatelitová nestabilita (MSI) a hypermetylace v CpG ostrůvcích promotorů genů (CIMP). Všechny tyto dráhy zahrnují genetické a molekulární změny, které způsobují defekt v regulačních mechanismech buňky, což má za následek nekontrolovatelnou proliferaci buněk, invazi nádoru a rozvoj metastáz (Minarikova 2016).

Nejvíce případů CRC vzniká cestou chromozomální nestability, která je charakterizována přítomností jednonukleotidových mutací (substituce, inserce, delece), alelických ztrát v tumor supresorových genech a dále změn počtu chromozomů (Pino 2010). Mikrosatelitová nestabilita odráží poškození genů mismatch repair systému v důsledku mutace. Třetí dráhou je aberantní metylace promotorových oblastí tumor supresorových genů v rámci CIMP, vedoucí k inhibici jejich transkripce (Curtin 2011).

CRC se vyskytuje ve dvou formách, sporadické (získané) a hereditární (dědičné), které se liší získáním i projevem onemocnění. Až 95 % případů kolorektálního karcinomu je forma sporadická, při které jsou přítomné mutace pouze v buňkách nádoru (tzv. somatické mutace) (Hisamuddin 2004). Tato forma CRC většinou vzniká procesem zvaným „adenom–karcinom sekvence“, což je pomalá transformace adenomatózního polypu v invazivní karcinom trvající až 15 let (Winawer 1993). Poprvé byl tento proces popsán v roce 1990 pány Vogelsteinem a Fearonem, proto se mu také říká Vogelsteinův model kolorektální karcinogeneze. Při tomto procesu dochází k postupnému hromadění mutací v tumor supresorových genech a protoonkogenech. V časně fázi rozvoje karcinomu je klíčová mutace v genu *APC*, následována mutací v genu *KRAS*. Dále adenom–karcinom sekvence pokračuje mutacemi a následně rozsáhlými delecemi v genu *DCC* a nakonec, ve fázi pokročilého karcinomu, lze detekovat inaktivační mutace a genové delece v tumor supresorovém genu *TP53* (obr. 3).



Obr. 3 Molekulární model kolorektální karcinogeneze (Senda 2005)

Hereditární formy CRC vznikají na základě vrozených mutací a vyskytují se v 3–5 % případů CRC. U této formy jsou inaktivované důležité tumor supresorové a mutátorové (mismatch repair) geny v linii zárodečných buněk (Brenner 2014). Hereditární formy zahrnují familiární adenomatózní polypózu (FAP), atenuovanou formu FAP, hereditární nepolypózní formu CRC (HNPCC), MYH asociovanou polypózu a polypózní syndromy (Rustgi 2007).

2.2.1.1 Nejčastěji využívané molekulární markery pro diagnostiku kolorektálního karcinomu

Mezi nejčastěji mutované a vyšetřované geny u CRC patří *APC*, *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* a *PIK3CA* (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

Geny *APC* a *TP53* jsou tzv. tumor supresorové geny. Ve zdravých buňkách tyto geny kódují proteinové produkty, které negativně regulují buněčnou proliferaci. Jsou to například negativní regulátory růstu, inhibitory v signálních drahách a negativní transkripční faktory. Dále tumor supresorové geny kódují aktivátory apoptózy nebo proteiny účastnící se opravy DNA. Ztráta funkce těchto genů má zásadní vliv při vzniku kolorektálního karcinomu, kdy dochází k nekontrolovanému dělení buněk. Pro inaktivaci těchto genů je nutné poškození obou alel (např. bodovou mutací, rozsáhlou delecí nebo hypermetylací) (Osborne 2004).

Gen *APC*

APC (adenomatous polyposis coli) gen je lokalizovaný na dlouhém raménku pátého chromozomu (5q21–22), skládá se z 15 exonů a jeho velikost je přibližně 108 kbp (Grodin 1991).

Tento gen je v rámci kolorektálního karcinomu nejčastěji mutovaným genem. Mutace v tomto genu byla detekována u 44 % z dostupných vzorků nádorové tkáně. Nejčastějším typem mutace jsou substituce (45.53 %). Velký počet mutací v *APC* genu se vyskytuje v kodónech 876 (exon 5) a 1450 (exon 15) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>; Miyaki 1994).

Gen *TP53*

Tumor supresorový gen *TP53* se nachází na krátkém raménku sedmnáctého chromozomu v oblasti 17p13.1 a je dlouhý 20 kbp (Seemann 2008). Mutace tohoto genu byla detekována u 43 % vzorků nádorové tkáně (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). Nejčastějším typem mutací jsou jednonukleotidové substituce, které jsou doprovázeny ztrátou druhé alely genu (Frebourg 1992). Nejvíce mutací je lokalizováno ve třech kodónech a to 175 (exon 5), 248 (exon 7) a 273 (exon 8) (Huang 1993; Mukhopadhyay 1993; Krajewska 2003).

Dalšími geny, ve kterých se u CRC vyšetřují mutace, jsou *KRAS* a *BRAF*. Tyto geny se řadí mezi tzv. protoonkogeny. Za normálních podmínek kódují protoonkogeny proteinové produkty, které stimulují růst a dělení buněk. V nádorových buňkách se tyto geny vyskytují v mutovaných formách zvaných onkogeny, u kterých došlo ke ztrátě vnější regulace a buňka se v důsledku jejich působení nekontrolovaně dělí. Nejčastějšími příčinami změny protoonkogenů na onkogeny jsou bodové mutace, které způsobí permanentní aktivaci onkoproteinu, a genové amplifikace, kdy se tvoří nadbytek proteinového produktu, a tím je jeho účinek znásoben. Pro změnu protoonkogenu na onkogen stačí přítomnost mutace na jedné alele protoonkogenu (Osborne 2004).

Gen *KRAS*

Gen *KRAS* patří do rodiny protoonkogenů Ras spolu s dalšími geny *HRAS* a *NRAS*. Nachází se na krátkém raménku dvanáctého chromozomu (12p12.1), jeho délka je přibližně 45 kbp a obsahuje 6 exonů (Mu 2004). Pokud je tento gen mutován, jde nejčastěji o mutace typu jednonukleotidových substitucí v kodónech 12 a 13 v exonu 2 (Matikas 2017). Mutace tohoto genu byla detekována u 34 % vzorků nádorové tkáně pacientů s CRC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

Vyhodnocení mutačního stavu genu *KRAS* a příbuzného genu *NRAS* u pacientů s pokročilým CRC je především důležité při volbě cílené biologické léčby. K biologické léčbě se využívají monoklonální protilátky Cetuximab a Panitumumab, které jsou namířeny proti extracelulární doméně receptoru pro epidermální růstový faktor (Egfr). Působením těchto inhibitorů se blokuje MAP–kinázová dráha aktivovaná proteinem Egfr a tím se zabráňuje buněčné diferenciaci a proliferaci (Chau 2009). Pokud jsou však v *RAS* genech přítomné mutace, tato dráha je spuštěna i bez působení Egfr proteinu a léčba je pak neúčinná, a tedy není doporučena. Vznik mutací může nastat i během léčby, v tomto případě se hovoří o získání rezistence k dané léčbě a je tudíž ukončena (Misale 2012).

Gen *BRAF*

Gen *BRAF* je součástí RAF rodiny serin/threonin kináz (Armaghany 2012). Nachází se na dlouhém raménku sedmého chromozomu (7q34) a obsahuje 21 exonů (Kamiyama 1993). Mutace tohoto genu byly nalezeny u sporadické formy kolorektálního karcinomu u 10 % pacientů. Ve většině případů se jedná o mutaci v kodónu 600 exonu 15, kdy dojde k záměně glutamátu za valin (V600E) (Armaghany 2012).

Posledním často mutovaným genem je **gen *PIK3CA***. Tento gen se nachází na dlouhém raménku třetího chromozomu v oblasti 3q26.32 a obsahuje 23 exonů (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene). Produkt genu *PIK3CA* se nazývá p110 α protein a tvoří katalytickou alfa podjednotku enzymu fosfatidylinositol–3–kinázy. Mutace *PIK3CA* genu jsou přítomné u 10–14 % případů kolorektálního karcinomu. Více než 80 % mutací se nachází ve třech místech, a to v kodónech 542 a 545 (exon 9) a v kodónu 1047 (exon 20) (Ogino 2014).

2.3 Metastatický kolorektální karcinom (mCRC)

2.3.1 Charakteristika a prognóza mCRC

Přibližně pětina pacientů má při počáteční diagnóze již přítomné vzdálené metastázy (www.svod.cz). Lokalizace, počet a velikost metastáz, tedy možnost či nemožnost jejich odstranění (resektabilita), má zásadní vliv na prognózu pacientů. Například u pacientů s již přítomnými jaterními metastázemi je možnost odstranění (resekce) jen u 20 % z nich a riziko návratu (rekurence) je u těchto pacientů až 50 % (Adam 2015).

Určitou prognostickou hodnotu má i lokalizace primárního tumoru. Nejhorší jsou na tom pacienti s lokalizací tumoru na vzestupném tračníku (colon ascendens), dále pak na sestupném tračníku (colon descendens) a nakonec pacienti s rakovinou konečníku, jejichž celková doba přežití je 2x vyšší než u pacientů s tumorem na vzestupném tračníku (El Messaoudi 2016).

Kolorektální karcinom může metastazovat jak cestou lymfatického systému (lymfogenní), jejímž výsledkem je obvykle infiltrace mízních uzlin, tak cestou krevní (hematogenní). Hematogenním rozsevem jsou nejčastěji postiženy játra a dále plíce, kdy vyšší riziko plicních metastáz je u pacientů s rakovinou konečníku než střeva (Wang 2004; Mítrý 2010). Důvodem je zřejmě přímé šíření rakovinných buněk do krevního oběhu skrze hemoroidální žíly (Hughes 1962).

U plicních metastáz, stejně jako u jaterních, platí, že u většiny pacientů není možné jejich chirurgické odstranění, což má negativní dopad na jejich prognózu. Mezi další místa, kde se mohou metastázy objevit, patří peritoneum (pobřišnice), centrální nervová soustava, kosti. Jsou známy i případy metastáz v nadledvinách a slezině (Vatandoust 2015).

Dalším prognostickým faktorem u metastatického CRC je synchronita metastáz neboli to, zda se vzdálené metastázy vyskytují současně s primárním tumorem (synchronní), nebo zda se objeví s odstupem času po chirurgickém odstranění primárního nádoru (metachronní). Z vědeckých studií se ukazuje, že pacienti se synchronními metastázemi mají lepší prognózu než s metachronními (Mekenkamp 2010).

2.3.2 Diagnostika mCRC

Zásadní vliv na prognózu pacienta s pokročilým CRC po odstranění tumorových ložisek má včasný záchyt nově vzniklých metastáz. Hlavními nástroji, které se využívají u těchto pacientů, je pravidelné sledování hladin vybraných tumorových markerů a zobrazovací metody (Vukobrat-Bijedic 2013).

2.3.2.1 Tumorové markery

Hladiny tumorových markerů se zjišťují z krevního vzorku pacienta. Hodnotí se dva markery, a to karcinoembryonální antigen (CEA) a tumorový antigen 19–9 (CA 19–9). Jejich zvýšená koncentrace může vypovídat o přítomnosti karcinomu, kdy dynamika hladin koreluje se změnou velikosti tumorových ložisek v čase, a proto se využívají při sledování terapeutického účinku léčby a detekci návratu onemocnění (Vukobrat-Bijedic 2013).

CEA je onkofetální glykoprotein, který je produkovaný v tkáních embrya a je součástí kolorektální sliznice u dospělých osob. Bylo zjištěno, že okolo 20 % kolorektálních tumorů neprodukuje zvýšené množství CEA, navzdory tomu, že již byly přítomny metastázy (Nicholson 2015).

Karbohydrátový antigen CA 19–9 je také glykoprotein, jehož hladiny se sledují v krevním vzorku pacienta a slouží jako marker pro diagnostiku kolorektálního karcinomu. Tento marker je ještě méně citlivý než marker CEA (Peltonen 2018).

Ani jeden z výše uváděných tumorových markerů tedy nedosahuje parametrů dostačujících k citlivé a specifické detekci nově vzniklých nádorových ložisek, a tak je sledování jejich hladin užíváno spíše jako doplňkový nástroj (Vukobrat-Bijedic 2013).

2.3.2.2 Zobrazovací metody

V současné době se v diagnostice pokročilého CRC nejvíce využívají magnetická rezonance (MRI), výpočetní tomografie (CT), sonografie a pozitronová emisní tomografie spojená s výpočetní tomografií (PET/CT). Každá z metod má své výhody a nevýhody, které by se daly shrnout do třech základních skupin. První je sensitivita a specifita, druhou je finanční, personální a přístrojová náročnost a třetí je zátěž pro pacienta při použití kontrastních látek a rentgenového záření. Nejméně zatěžující a finančně náročná metoda je sonografie, ale její sensitivita i specifita patří k nejnižším. Oproti tomu PET/CT má nejvyšší sensitivitu a specifitu, ale také nejvyšší náročnost i zátěž pro pacienta plynoucí z podání kontrastní látky a použití radioaktivní glukózy. U CT je sensitivita a specifita závislá na konkrétním typu a umístění ložiska a jeho hlavní nevýhodou je rentgenové záření a podání kontrastní látky. MRI má o něco vyšší sensitivitu než CT, avšak nároky na přístrojové vybavení i finance jsou o mnoho vyšší a je zde také nutnost použití kontrastní látky (Sun 2008; Bor 2016).

3. Cirkulující nádorová DNA

3.1 Historie ctDNA

Molekuly DNA volně kolující v lidské plazmě byly poprvé popsány v roce 1948 Mandelem a Métaisem, ale až půl století poté byly klinicky využity. V roce 1997 Lo et al. vyřkli hypotézu, že lidský plod uvolňuje svou DNA do krve matky. Ve studii prokázali, že ženy, které nesly mužský plod, mají ve své plazmě Y chromozomální DNA. Tento výzkum proměnil metody prenatalního screeningu a umožnil zjišťování pohlaví plodu a chromozomálních abnormalit z krevního testu bez intrauterinního zásahu (Chiu 2012).

Cirkulující nádorová DNA (ctDNA) byla poprvé popsána v roce 1977 a od té doby je potvrzeno, že obsahuje typické mutace přítomné v rakoviných buňkách (Leon 1977). Zpočátku byla podrobnější charakterizace ctDNA pomalá kvůli technologickým omezením. K významnému pokroku ve výzkumu došlo až v posledních deseti letech s příchodem NGS (Next Generation Sequencing) a dalších moderních technologií (Newman 2014).

3.2 Původ a mechanismus uvolňování do krevního řečiště

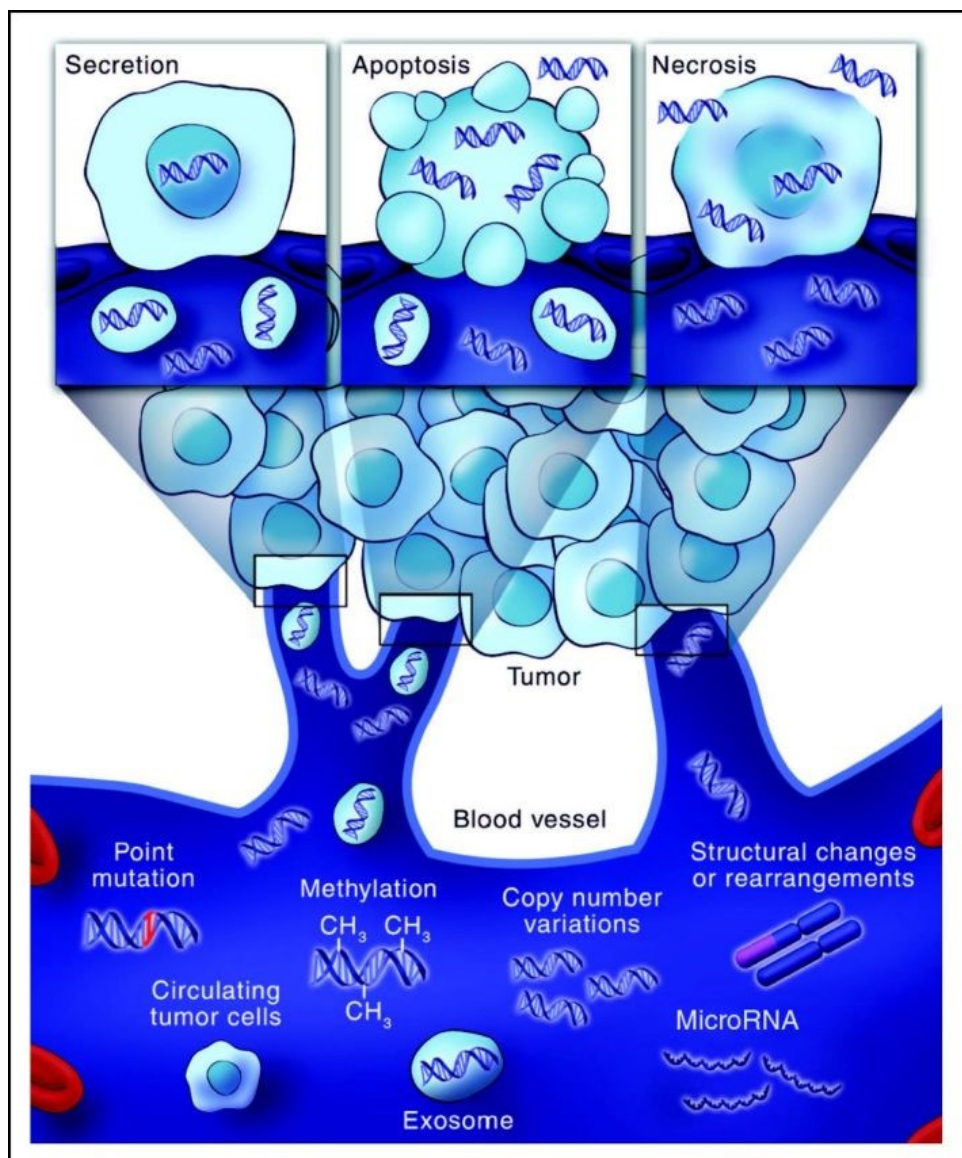
Původ, ani přesný mechanismus uvolňování ctDNA do krevního oběhu ještě nejsou zcela objasněny. Je známo, že cirkulující bezbuněčnou DNA (cfDNA) můžeme najít v lidské plazmě, séru a dalších tělních tekutinách. Tato cfDNA je uvolňována do krevního řečiště jak normálními (zdravými), tak nádorovými buňkami. Uvolňování se děje dvěma mechanismy. Pasivním z buněk, které prochází apoptózou nebo nekrózou a aktivním – živými nádorovými buňkami (Stroun 2001). K rozlišení ctDNA od nenádorové cfDNA se využívá skutečnosti, že ctDNA je charakterizována přítomností mutací, které jsou pouze v genomu rakovinových a prekancerózních buněk a nejsou přítomny v genomu zdravých buněk stejného jedince (Diaz 2014).

3.2.1 Pasivní mechanismus

Za pasivní mechanismus se považuje uvolňování nukleových kyselin do krevního oběhu z apoptických nebo nekrotických buněk. Apoptóza, jinými slovy programovaná buněčná smrt, je regulovaný děj zajišťující eliminaci nepotřebných a aberantních buněk. Během apoptózy dochází ke smrštění buněk, kondenzaci chromatinu, fragmentaci jaderné DNA a rozpadu na malé části obalené plazmatickou membránou – tzv. apoptická tělíska, která jsou v konečné fázi pohlcena makrofágy.

Nekróza je patologický proces buněčné smrti, který je vyvolán mechanickými, chemickými či biologickými vlivy. V průběhu nekrózy je rozrušena integrita plazmatické membrány a výsledkem je lyze buněk a vylití buněčného obsahu do okolí (Brouckaert 2004).

Oba tyto děje závisí na lokalizaci, velikosti a prokrvení nádoru. Při zvětšování objemu nádoru se zároveň zvětšuje i buněčný obrat, a tím tedy i počet apoptických a nekrotických buněk. Za normálních fyziologických podmínek jsou zbytky po těchto buňkách odstraňovány fagocytujícími buňkami (např. makrofágy), což se ale dostatečně účinně neděje v nádorové masě. Proto se tento buněčný odpad hromadí a je uvolňovaný do krevního oběhu spolu s fragmentovanou DNA, jak ukazuje obrázek číslo 4 (Diaz 2014).



Obr.4 Možné způsoby uvolňování ctDNA do krevního řečiště (Diaz 2014).

3.2.2 Aktivní mechanismus

Už u pacientů v časném stádiu rakoviny může být zvýšená hladina ctDNA v krvi. A jelikož se předpokládá, že v tomto stádiu jen málo buněk podléhá smrti, musí pravděpodobně existovat i jiný zdroj ctDNA, než jsou apoptické a nekrotické buňky. Tímto zdrojem mohou být žijící nádorové buňky. Mezi další důkazy podporující hypotézu o uvolňování ctDNA přímo z žijících nádorových buněk patří skutečnost, že se mnoho rakovinných buněk dokáže vyhnout apoptóze a že se množství ctDNA zvyšuje s růstem nádoru (Stroun 2001; Newman 2014).

Aktivní uvolňování ctDNA živými nádorovými buňkami pravděpodobně nastává skrze exosomy, což jsou malé membránové váčky sekretované různými typy buněk, které vznikají jako výsledek endocytózy, kdy multivezikulární tělíska splývají s plazmatickou membránou a uvolňují se do extracelulárního prostoru. Mohou tedy obsahovat různé molekuly, jako např. lipidy, proteiny, RNA a také DNA. Exosomy jsou schopné vstupovat do vzdálených buněk buď navázáním na jejich povrchové receptory pomocí adhezivních molekul, anebo endocytózou a hrají tak roli v mezibuněčné signalizaci a komunikaci (García-Casas 2017). Přesný způsob, jakým k uvolňování dochází, zatím není znám, ale je popsáno, že žijící nádorové buňky jsou schopné uvolňovat pomocí exosomů zejména nově syntetizované části své DNA (Stroun 2001; García-Casas 2017). Zdá se, že důvodem je přenos svého genetického materiálu do vzdálených buněk, kdy se tomuto jevu říká genomastáze. Teorie genomastáze vychází z myšlenky, že samotná ctDNA má onkogenní potenciál a může maligně transformovat zdravé buňky. Prozatím dvě skupiny vědců ukázaly, že pokud jsou zdravé buňky kultivované v séru od pacientů s nádorem, tak dochází k aktivnímu přijímání nádorové DNA obsažené v exosomech. Po následné injekci takto infikovaných buněk do imunodeficientních myší byly schopné vytvořit nádory histologicky shodné s nádory od dárců plazmy (García-Olmo 2010; Abdouh 2017).

Hypotéza, že ctDNA pochází z cirkulujících nádorových buněk (CTC) je také možná, ovšem frakce takové ctDNA je zcela minoritní (Bettegowda 2014).

3.3 Míra fragmentace ctDNA

Míra fragmentace neboli integrita DNA je definována jako poměr delších fragmentů DNA ke kratším. Délka fragmentů cfDNA se liší v závislosti na mechanismu uvolňování z buňky. Obecně se dá říci, že fragmentace cfDNA je vyšší po apoptóze než po nekróze nebo fagocytóze. Apoptóza obvykle probíhá v normálních tkáních a vznikají při ní krátké homogenní DNA fragmenty. Jejich nejčastější délka je okolo 145–180 bp (nebo jejich násobky), což odpovídá délce DNA navinuté okolo nukleozomů, ale mohou být i kratší než 100 bp. Naproti tomu při nekróze, coby obvyklé formě buněčné smrti v nádorové tkáni, se vytváří delší fragmenty různé velikosti z důvodu náhodného rozštěpení nukleázami a mohou dosahovat délky větší než 10 000 bp (Jahr 2001).

V několika studiích bylo prokázáno, že pacienti s nádorovým onemocněním mají více fragmentovanou cfDNA nežli zdravé kontroly a její velikost se pohybuje ve velikostech 170 bp a méně (Umetani 2006). U těchto pacientů se však vyskytují i dlouhé fragmenty DNA, a tak integrita DNA dosahuje vyšších hodnot. Tato velikostní heterogenita ctDNA se pravděpodobně odvíjí od různých způsobů jejího vzniku a uvolňování do krevního řečiště, ovšem přesné souvislosti ještě známy nejsou. V současné době se vztahy mezi délkou ctDNA a jejím původem zkoumají pomocí nových technologií na principu NGS. Po jejím bližším objasnění by pak podrobná analýza velikosti cfDNA fragmentů u pacienta s nádorovým onemocněním mohla umožnit konkrétněji identifikovat nádorovou a nenádorovou cirkulující DNA a poskytnout cenné informace týkající se diagnózy a prognózy (Robert 2011; Anker 2016).

3.4 Vyšetření ctDNA

Existují dva možné přístupy analýzy ctDNA. Prvním z nich je úvodní mutační analýza nádorové tkáně, kdy se vyšetřuje konkrétní panel mutací specifických pro daný typ nádoru, pro CRC viz kapitola 2.2.1.1, a následně se detekují zachycené mutace v cfDNA izolované z plazmy. Tento přístup vyžaduje dostupnost vzorku nádoru, což ale není vždy možné, a záchyt se omezuje pouze na mutace obsažené v konkrétní analyzované nádorové tkáni. Druhý přístup obchází obě tyto nevýhody tím, že se panelová mutační analýza provádí přímo na cfDNA. To je však o mnoho náročnější proces, protože takové vyšetření vyžaduje, na rozdíl od tkáňových vzorků, speciální techniky vykazující vysokou specifitu i citlivost (Belic 2015; Tie 2017).

Problémem při vyšetření ctDNA je její velice nízká frakce v periferní krvi, pohybující se od desítek až k setinám procent v nadbytku celkové nenádorové DNA (Schmidt 2008). Pro analýzu ctDNA jsou klíčové dvě věci: izolace cfDNA s co nejvyšší frakcí ctDNA a dostatečně citlivá metoda k její následné detekci (Tie 2017).

3.4.1 Příprava vzorků a izolace ctDNA

Nádorová tkáň se získává chirurgicky, nebo při tkáňové biopsii. Vzorek tkáně je fixován formalínem a zalit do parafrinového bločku (FFPE, Formalin Fixed Paraffin Embedded). Z tohoto vzorku se poté izoluje a kvantifikuje DNA. K tomu se využívají běžné izolační kity na principu kolonek a následně se pomocí PCR amplifikuje panel nejvýznamnějších mutací.

Při přípravě vzorku pro analýzu ctDNA se nejprve odebere pacientům krev do zkumavek s antikoagulační látkou (např. EDTA) a centrifugací se odseparuje plazma. Při přípravě se musí pracovat opatrně, aby nepopraskaly membrány krevních buněk, a zabránilo se tak kontaminaci vzorku jejich DNA. Následně je ctDNA z plazmy izolována a purifikována pomocí speciálních kolonkových kitů, které preferenčně slouží k izolaci krátkých fragmentů (Lee 2001). Takových je na trhu sice celá řada, ale výtěžnost ctDNA se liší, a proto je jejich výběr zcela zásadní (Kloten 2017; Warton 2018).

3.4.2 Analýza ctDNA

Metod používaných pro detekci ctDNA existuje několik, neustále se vyvíjejí a postupně se zvyšuje jejich citlivost. V rutinní praxi se nejčastěji využívá real-time PCR (qPCR). Principem qPCR je klasická PCR, ale navíc umožňuje přímo zaznamenávat nárůst PCR produktu v každém cyklu. Amplifikace cílových sekvencí DNA je sledována díky fluorescenci emitované v průběhu PCR, kdy se používají speciální fluorescenční sondy vážící se na mutovanou DNA (Heid 1996; Gibson 2006). Citlivost této metody se pohybuje se v rozmezí 1–2 % (Rapisuwon 2016).

Vhodnější z hlediska citlivosti a specifity jsou techniky založené na digitálním PCR spolu s metodou BEAMing. Metoda BEAMing (beads, emulsion, amplification and magnetics) spočívá v zachycení DNA na magnetické kuličky a k její následné analýze pomocí digitální PCR (Diehl 2005). Citlivost této metody je 0,01 % (Schmidt 2008; Taniguchi 2011). Digitální PCR (dPCR) umožňuje absolutní kvantifikaci molekul cílové DNA. Při dPCR se rozděluje analyzovaný vzorek do tisíců až milionů reakčních segmentů, což mohou být mikrokomůrky na čípech nebo mikrokapky olejové emulze (ddPCR). V každém ze segmentů jsou molekuly DNA individuálně amplifikovány klasickým PCR. Pokud v daném segmentu došlo k amplifikaci, je zachycen pozitivní fluorescenční signál a znamená to, že je přítomna cílová DNA. Pokud v segmentu molekula cílové DNA není, k amplifikaci nedojde a fluorescenční signál je nulový. Množství fluorescenčně pozitivních segmentů odpovídá absolutnímu počtu molekul cílové DNA ve směsi (Taly 2013). U této metody je citlivost detekce 0,01–0,10 % (Zhang 2015; Zheng 2016; Zonta 2016).

Další metodou je sekvenování, konkrétně technologie sekvenování nové generace (NGS) se speciálními modifikacemi zajišťujícími zvýšení citlivosti metody. Jedním z příkladů takové NGS technologie je metoda CAPP-Seq (CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing), která slouží ke kvantifikaci ctDNA. Princip spočívá v hybridizaci sond („selektorů“) z biotinylovaných DNA oligonukleotidů s mutovanými oblastmi typickými pro daný typ rakoviny. Selektor se nejprve přidá k nádorové i normální DNA, aby se zjistily mutace specifické pro daného pacienta, a poté se ten samý selektor přidá k ctDNA ke kvantifikaci těchto mutací. Metoda CAPP-Seq má limit detekce 0,02 % (Newman 2014).

Pro identifikaci vzácných mutací se používá další metoda na principu NGS, Safe-SeqS (Safe-Sequencing System), využívající unikátní identifikátory (UIs). UI jsou sekvence, které jsou při této metodě připojovány ke každé templátové molekule a amplifikovány, čímž se vytvoří jednotlivé skupiny sekvencí rozdělených podle připojeného UI. Dalším krokem je opakovaná (redundantní) sekvenace amplifikačních produktů. Pouze odchylka přítomná ve více než 95 % PCR produktů se stejným UI je považována za mutantní, a nikoliv jako výsledek sekvenační chyby (Wu 2011). Metoda Safe-Seqs má citlivost 0,01–0,5 % (Belic 2015).

3.5 CtDNA u pokročilého kolorektálního karcinomu a její klinické využití

3.5.1 Záchyt

Hladina ctDNA v plazmě pacientů s mCRC je významně vyšší v porovnání se zdravými jedinci (Frattini 2005). Tuto informaci ale nelze brát za obecný fakt, protože ne všichni pacienti s pokročilým metastatickým onemocněním uvolňují do plazmy ctDNA v měřitelném množství. Bylo zjištěno, že někteří pacienti sice mají zvýšené množství cirkulující DNA v plazmě, ta ale obsahuje wild-type sekvence a jen malou frakci tvoří mutovaná DNA odvozená z nádoru (Heitzer 2013).

Obecně můžeme shrnout, že se záchyt ctDNA u pacientů s mCRC pohybuje od 70 % do 100 % podle použité metody (Vogelius 2012; Taly 2013; Mollevi 2014; Spindler 2015; Bettgowda 2014; Thierry 2017).

3.5.2 Dlouhodobé pooperační sledování pacientů

Dlouhodobé pooperační sledování pacientů je důležité pro časný záchyt návratu neboli rekurence onemocnění a následnou chirurgickou nebo chemoterapeutickou léčbu (Schmidt 2008; Huang 2018).

Koncentrace ctDNA klesá po odstranění nádoru z těla, ale při rekurenci nebo objevení metastáz se koncentrace zase zvýší (Frattini 2005). Poločas rozpadu ctDNA je menší než 2 hodiny, tudíž podává informace o aktuálním stavu a vývoji onemocnění. Díky tomu také mohou být změny v její koncentraci zjevné dny nebo týdny předtím, než by se nárůst nádorové masy objevil při konvenční zobrazovací metodě nebo pomocí sérových biomarkerů (Flamini 2006).

Většinou se hladina ctDNA měří před operací a poté po operaci v pravidelných časových intervalech. Reinert et al. (2016) udělali retrospektivní studii, která zahrnovala 11 pacientů s CRC, kteří byli léčeni chirurgickým odstraněním nádoru a u kterých vyhodnocovali 151 sériově sebraných vzorků plazmy v průběhu 36měsíčního sledování. U šesti pacientů došlo k rekurenci onemocnění a u pěti ne.

K detekci změn v koncentraci ctDNA využili analýzu 2–6 nádorově specifických mutací pro každého pacienta metodou ddPCR. Tyto ctDNA analýzy rozpoznaly rekurenci u všech šesti pacientů, a naopak ji vyvrátily u zbývajících pěti, což vypovídá o specifitě i sensitivitě 100 %. V této práci potvrdily informace Frattiniho z roku 2005, že existuje úzký vztah mezi hladinou ctDNA v plazmě a aktuálním klinickým stavem pacienta. Obecně hladina alespoň na krátkou dobu zcela poklesne po nějakém léčebném zásahu, jako například chirurgickém odstranění, radiofrekvenční ablacii a chemoterapii a poté se rapidně zvýší při rekurenci. Zde se také potvrdila výhoda ctDNA oproti běžným diagnostickým metodám, kdy u všech šesti pacientů analýza ctDNA odhalila rekurenci dříve než tyto diagnostické metody.

3.5.3 Radikalita operace

CtDNA také slouží k potvrzení radikality operace. Primární snahou chirurgů je odstranit veškerou nádorovou masu z těla, což je označováno jako tzv. R0 kurativní resekce. Pokud se takový výkon z různých důvodů nepovede a v těle zůstanou mikroskopické či makroskopické zbytky nádoru, hovoříme o tzv. R2 resekci. Někteří autoři se zabývali vztahem mezi mírou radikality operace a přítomností či nepřítomností ctDNA. Předpokládaný stav je ten, že po R0 resekci by v krvi neměla být ctDNA přítomna. Pokud přítomna je, znamená to, že v těle pacienta zůstal zbytek nádorové tkáně a jedná se o R2 resekci. Výsledky vědeckých studií tuto hypotézu potvrzují a detekci ctDNA lze potenciálně využít jako pomocný nástroj při zhodnocení radikality resekce (Zhou 2016; Benesova).

3.5.4 Sledování odpovědi na léčbu

Účinnost léčby nádorového onemocnění se hodnotí na základě změn v množství nádorové hmoty v těle. Tyto změny lze nepřímo hodnotit prostřednictvím sledování dynamiky hladin ctDNA (Yi 2017). Garlan et al. (2017) ve své studii řešili, jak mohou časné změny v koncentraci ctDNA predikovat účinnost první nebo druhé linie chemoterapie u pacientů s mCRC. Analýza ctDNA byla provedena v plazmě odebrané před prvním (C0), druhým (C1) anebo třetím (C2) cyklem chemoterapie, kdy hodnotili mutace v genech *KRAS*, *BRAF*, *TP53* a hypermetylace v genech *WIFI* a *NPY* pomocí metody ddPCR. Podle změn v koncentraci ctDNA během léčby rozdělili pacienty zařazené do studie na „dobré respondenty“, u kterých nádor zareagoval na léčbu a poklesla koncentrace ctDNA, a na „špatné respondenty“, u kterých k výraznému poklesu nedošlo. Výsledky ukázaly, že změna v koncentraci ctDNA je relevantní marker terapeutické účinnosti u pacientů s mCRC, ale pro potvrzení vyžaduje další a rozsáhlejší studie.

3.5.5 Vznik rezistence na léčbu

V současné době stále narůstají možnosti cílené terapie a dochází k personalizaci onkologické léčby na základě genetických charakteristik nádorů. Přesná genotypizace nádoru je tudíž nezbytná pro vhodný výběr léčby u konkrétního pacienta (Bratman 2015). Pro tento účel je u mCRC stěžejní vyhodnocení mutačního stavu genů *KRAS* a *NRAS*, které rozhoduje o vhodnosti podání biologické léčby na principu EGFR inhibitorů (Chau 2009). Téměř u všech nádorů se však vlivem podávání těchto inhibitorů časem objeví mutace, kvůli kterým se nádor stane sekundárně rezistentním. Včasná detekce těchto mutací v průběhu léčby může napomoci k rychlému zareagování na vzniklou rezistenci pozměněním léčby (Bratman 2015). Opakované biopsie nádorové tkáně však v průběhu léčby nejsou možné, a tak vyšetřování vybraných mutací v ctDNA se ukazuje jako velmi přínosný pomocník při zachytu rezistence. Ta je nejčastěji způsobena mutacemi v genech *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* a *EGFR* a dále pak amplifikacemi genů *ERBB2* nebo *MET* (Yonesaka 2011; Misale 2012; Montagut 2012; Williams 2012; Bardelli 2013; Arena 2014).

3.5.6 Prognostický marker

CtDNA slouží také jako prognostický marker. Bettegowda et al. (2014) ve své studii zaznamenali vztah mezi hladinami ctDNA u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem a délkou přežití. Zjistili, že pacienti, kteří měli poměrně nízkou hladinu ctDNA, žili významně déle, než pacienti s vyšší hladinou ctDNA. Toto zjištění pak potvrdily další výzkumné skupiny (Sefrioui 2015; El Messaoudi 2016).

4. Závěr

Metastatický kolorektální karcinom je závažné onemocnění, které i přes neustále se vyvíjející postupy diagnostiky a léčby vykazuje vysokou úmrtnost. Rozhodujícím faktorem pro příznivější prognózu pacientů s tímto onemocněním je možnost chirurgického odstranění všech nádorových ložisek s následným důkladným a dlouhodobým sledováním pacienta pro záchyt případného návratu onemocnění. U pacientů s neoperabilními nádory je to pak průběžné monitorování odpovědi na probíhající léčbu. V obou případech je cílem časný záchyt nových ložisek či zvětšování objemu těch stávajících pro jejich okamžité odstranění nebo změnu léčby. Současné diagnostické nástroje používané v klinické praxi na principu zobrazovacích metod a biochemických markerů mají svá omezení, kvůli kterým se ne vždy podaří progresi onemocnění včas zachytit, a tak se hledají nové možnosti pro zlepšení této diagnostiky.

CtDNA, která se vyskytuje téměř u všech typů nádorových onemocnění, se v poslední době stává jedním z nejslibnějších molekulárně-onkologických markerů, a to zejména pro svoji univerzálnost, vysokou specifitu a při vhodně zvoleném postupu detekce i vysokou citlivost. Svou roli hraje zejména u pacientů s pokročilou formou onemocnění, konkrétně při jejich dlouhodobém sledování během nebo po prodělané léčbě.

Tato práce shrnuje současné poznatky o původu a vlastnostech ctDNA. Dále se zaměřuje na její konkrétní klinické využití u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem. Jedná se především o průběžné hodnocení aktuální nádorové hmoty. S tím souvisí hodnocení radikality operace, časný záchyt nových ložisek a sledování odpovědi na léčbu a dále pak stanovení klíčových mutací pro předpověď účinnosti onkologické léčby.

5. Seznam literatury

- Abdoun, Hamam, Gao, Arena V., Arena M., Arena G. O. „Exosomes isolated from cancer patients’ sera transfer malignant traits and confer the same phenotype of primary tumors to oncosuppressor-mutated cells.“ *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017: 36:113.
- Adam, de Gramont, Figueras et al. „Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus.“ *Cancer Treat Rev*, 2015: 729–741.
- Anker, Thierry, El Messaoudi, Gahan, Stroun. „Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology.“ *Cancer Metastasis Reviews*, 2016: 347-376.
- Arena, Misale, Lamba, Siravegna, Lallo, Hobor et al. „Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer .“ *Sci Transl Med*, 2014: 224ra26.
- Armaghany, Wilson, Chu, Mills. „Genetic Alterations in Colorectal Cancer.“ *Gastrointestinal Cancer Research*, 2012: 19-27.
- Bardelli, Corso, Bertotti, Hobor, Valtorta, Siravegna et al. „Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer.“ *Cancer Discov*, 2013: 658-73.
- Belic, Koch, Ulz, Auer, Gerhalter, Mohan, Fischereder, Petru, Bauernhofer, Geigl, Speicher, Heitzer. „Rapid Identification of Plasma DNA Samples with Increased ctDNA Levels by a Modified FAST-SeqS Approach.“ *Clin Chem*, 2015: 838-49.
- Benesova, Belsanova, Halkova, Pudil, Ryska, Levy, Simsa, Pazdirek, Hoch, Blaha, Minarik. „The significance of postoperative follow-up of patients with advanced colorectal cancer using circulating tumor DNA.“ (v přípravě)
- Bettegowda, Sausen, Leary et al. „Detection of Circulating Tumor DNA in Early-and Late- Stage Human Malignancies.“ *Science translational medicine*, 2014: 224ra24.
- Bor, Fábíán, Szepes. „Role of ultrasound in colorectal diseases.“ *World Journal of Gastroenterology*, 2016: 9477-9487.
- Bratman, Newman, Alizadeh, Diehn. „Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq.“ *Expert review of molecular diagnostics*, 2015: 715-719.
- Brenner, Kloor, Pox. „Colorectal cancer.“ *Lancet*, 2014: 1490-502.
- Brouckaert, Kalai, Krysko, Saelens, Vercammen, Ndlovu, Matladi, Vandenabeele. „Phagocytosis of Necrotic Cells by Macrophages Is Phosphatidylserine Dependent and Does Not Induce Inflammatory Cytokine Production.“ *Molecular Biology of the Cell*, 2004: 1089-1100.
- Curtin, Slaterry, Samowitz. „CpG Island Methylation in Colorectal Cancer: Past, Present and Future.“ *Pathology Research International*, 2011: 2011:902674.
- Diaz, Bardelli. „Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA.“ *Journal of Clinical Oncology*, 2014: 579-586.

- Diehl, Li, Dressman et al. „Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005: 16368– 16373.
- Dusek, Pavlik, Majek, Buchler, Muzik, Maluskova, Koptikova, Bortlicek, Abrahamova. „Odhady incidence, prevalence a počtu onkologických pacientů léčených protinádorovou terapií v letech 2015 a 2020 – analýza Národního onkologického registru ČR.“ *Klin Onkol*, 2015: 30-43.
- El Messaoudi, Mouliere, Du Manoir, Bascoul-Mollevi, Gillet, Nouaille, Fiess, Crapez, Bibeau, Theillet, Mazard, Pezet, Mathonnet, Ychou, Thierry. „Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care.“ *Clin Cancer Res*, 2016: 3067-77.
- Fearon, Vogelstein. „A genetic model for colorectal tumorigenesis.“ *Cell*, 1990: 759-67.
- Flamini, Mercatali, Nanni, Calistri, Nunziatini, Zoli, Rosetti, Gardini, Lattuneddu, Verdecchia. „Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer.“ *Clin. Cancer Res*, 2006: 6985–6988.
- Frank. „Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution.“ *Princeton University Press*, 2007.
- Frattini, Balestra, Verderio, Gallino, Leo, Sozzi, Pierotti, Daidone. „Reproducibility of a semiquantitative measurement of circulating DNA in plasma from neoplastic patients.“ *J. Clin. Oncol*, 2005: 3163–3164.
- Frebourg, Friend. „Cancer risks from germline p53 mutations.“ *Journal of Clinical Investigation*, 1992: 1637-1641.
- García-Casas, García-Olmo D. C., García-Olmo D. „Further the liquid biopsy: Gathering pieces of the puzzle of genom metastasis theory.“ *World Journal of Clinical Oncology*, 2017: 378-388.
- García-Olmo, Domínguez, García-Arranz, Anker, Stroun, García-Verdugo, García-Olmo D. „Cell-Free Nucleic Acids Circulating in the Plasma of Colorectal Cancer Patients Induce the Oncogenic Transformation of Susceptible Cultured Cells.“ *Cancer Research*, 2010: 560-567.
- Garlan, Laurent-Puig, Sefrioui, Siauve, Didelot, Sarafan-Vasseur, Michel, Perkins, Mulot, Blons, Taieb, Di Fiore, Taly, Zaanani. „Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients (PLACOL Study).“ *Clinical Cancer Research*, 2017: 5416-25.
- Gibson. „The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis.“ *Clin Chim Acta*, 2006: 32-47.
- Groden, Thliveris, Samowitz, Carlson, Gelbert, Albertsen, Joslyn. „Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene.“ *Cell*, 1991: 589-600.
- Hanahan, Weinberg. „The hallmarks of cancer.“ *Cell*, 2000: 57-70.
- Heid, Stevens, Livak, Williams. „Real Time Quantitative PCR.“ *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1996: 986-994.

- Heitzer, Auer, Hoffmann, Pichler, Gasch, Ulz, Lax, Waldispuehl-Geigl, Mauermann, Mohan. „Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer.“ *Int. J. Cancer*, 2013: 346–356.
- Hisamuddin, Yang. „Genetics of Colorectal Cancer.“ *Medscape General Medicine*, 2004: 6(3):13.
- Huang, Sun, Cheng, Huang K., Liu, He, Xia. „Monitoring colorectal cancer following surgery using plasma circulating tumor DNA.“ *Oncology Letters*, 2018: 4365-4375.
- Huang, Taki, Adachi, Konishi, Higashiyama, Miyake. „Mutations in exon 7 and 8 of p53 as poor prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer.“ *Oncogene*, 1993: 2469-77.
- Hughes, Cuthbertson. „Recurrence after curative excision of carcinoma of the large bowel.“ *JAMA*, 1962: 1303-1306.
- Chan, Giovannucci. „Primary prevention of colorectal cancer.“ *Gastroenterology*, 2010: 2029-2043.
- Chau, Cunningham. „Treatment in advanced colorectal cancer: what, when and how?“ *British Journal of Cancer*, 2009: 1704 – 1719.
- Chiu, Lo. „Noninvasive prenatal diagnosis empowered by high-throughput sequencing.“ *Prenat. Diagn*, 2012: 401–406.
- Jahr, Hentze, Englisch, Hardt, Fackelmayer, Hesch, Knippers. „DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells.“ *Cancer Research*, 2001: 1659-1665.
- Jess, Rungoe, Peyrin-Biroulet. „Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies.“ *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012: 639-45.
- Kamiyama, Aoki, Yuasa. „B-raf Oncogene: Activation by Rearrangements and Assignment to Human Chromosome 7.“ *Japanese Journal of Cancer Research*, 1993: 250–256.
- Kashida, Kudo. „Early colorectal cancer: concept, diagnosis, and management.“ *Int J Clin Oncol*, 2006: 1-8.
- Kinde, Tie, Wang, Wong, Roebert, Christie, Tacey, Singh, Karapetis, Desai J, Tran, Strausberg, Diaz Jr, Papadopoulos, Kinzler, Vogelstein, Gibbs. „Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer.“ *Ann Oncol*, 2015: 1715-22.
- Kloten, Rüchel, Brüchle et al. „Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of KRAS mutations using Intplex allele-specific PCR.“ *Oncotarget*, 2017: 86253-86263.
- Krajewska, Stawińska, Bryś, Młynarski, Witas, Okruszek, Kiliańska. „Genotyping of p53 codon 175 in colorectal cancer.“ *Med Sci Monit*, 2003: 188-91.
- Lee, Montalvo, Chrebtow, Busch. „Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma.“ *Transfusion*, 2001: 276–282.
- Leon, Shapiro, Sklaroff, Yaros. „Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy.“ *Cancer Res*, 1977: 646-650.

- Levy, Benesova, Lipska, Belsanova, Minarikova, Veprekova, Zavoral, Minarik. „Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients.“ *Anticancer Res*, 2012: 1621-6.
- Lo, Corbetta, Chamberlain, Rai, Sargent, Redman, Wainscoat. „Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.“ *Lancet*, 1997: 485-487.
- Matikas, Voutsina, Lagoudaki, Hatzidaki, Trypaki, Stoupis, Tzardi, Mavroudis, Georgoulas. „Detection of KRAS Exon 2 Mutations in Circulating Tumor Cells Isolated by the ISET System from Patients with RAS Wild Type Metastatic Colorectal Cancer.“ *Trans Oncol*, 2017: 693-698.
- Mekenkamp, Koopman, Teerenstra, van Krieken, Mol, Nagtegaal, Punt. „Clinicopathological features and outcome in advanced colorectal cancer patients with synchronous vs metachronous metastases.“ *British Journal of Cancer*, 2010: 159-164.
- Minarikova, Benesova, Halkova et al. „Longitudinal molecular characterization of endoscopic specimens from colorectal lesions.“ *World Journal of Gastroenterology*, 2016: 4936-4945.
- Misale, Yaeger, Hobor et al. „Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti EGFR therapy in colorectal cancer.“ *Nature*, 2012: 532-536.
- Mitry, Guiu, Coscnea et al. „Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study.“ *Gut*, 2010: 1383-1388.
- Miyaki, Konishi, Kikuchi-Yanoshita, Enomoto, Igari, Tanaka, Muraoka, Takahashi, Amada, Fukayama et al. „Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors.“ *Cancer Res*, 1994: 3011-20.
- Mollevi, Thierry, Mouliere, El Messaoudi, Lopez-Crapez, Rolet et al. „Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA.“ *Nat Med*, 2014: 430-5.
- Montagut, Dalmases, Bellosillo, Crespo, Pairet, Iglesias et al. „Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer.“ *Nat Med*, 2012: 221-3.
- Mouliere, El Messaoudi, Gongora, Guedj, Robert, Del Rio, Molina, Lamy, Lopez-Crapez, Mathonnet. „Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high KRAS or BRAF mutation load.“ *Transl. Oncol*, 2013: 319-328.
- Mu, Peng, Xu. „Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience.“ *World J Gastroenterol*, 2004: 471-5.
- Mukhopadhyay, Roth. „A codon 248 p53 mutation retains tumor suppressor function as shown by enhancement of tumor growth by antisense p53.“ *Cancer Res*, 1993: 4362-6.
- Newman, Bratman, To, Wynne, Eclov, Modlin, Liu, Neal, Wakelee, Merritt, Shrager, Loo Jr, Alizadeh et al. „An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage.“ *Nat Med*, 2014: 548-554.

- Nicholson, Shinkins, Pathiraja et al. „Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer.“ *Cochrane Database Syst Rev*, 2015: 12:CD011134.
- Ogino, Lochhead, Giovannucci, Meyerhardt, Fuchs, Chan. „Discovery of Colorectal Cancer PIK3CA Mutation as Potential Predictive Biomarker: Power and Promise of Molecular Pathological Epidemiology.“ *Oncogene*, 2014: 2949-2955.
- Osborne, Wilson, Tripathy. „Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications.“ *Oncologist*, 2004: 361-77.
- Pallisgaard, Spindler, Appelt, Andersen, Schou, Nielsen et al. „Clinical utility of KRAS status in circulating plasma DNA compared to archival tumour tissue from patients with metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor therapy.“ *Eur J Cancer*, 2015: 2678—85.
- Peltonen, Österlund, Lempinen, Nordin, Stenman, Isoniemi. „Postoperative CEA is a better prognostic marker than CA19-9, hCG β or TATI after resection of colorectal liver metastases.“ *Tumor Biology*, 2018: 1-9.
- Pino, Chung. „The chromosomal instability pathway in colon.“ *Gastroenterology*, 2010: 2059-2072.
- Rapisuwon, Vietsch, Wellstein. „Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment.“ *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2016: 211–222.
- Reinert, Schøler, Thomsen et al. „Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery.“ *Gut*, 2016: 625–634.
- Robert, Mouliere, Arnau Peyrotte, Del Rio, Ychou et al. „High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA.“ *PLoS ONE*, 2011: e23418.
- Rustgi. „The genetics of hereditary colon cancer.“ *Genes Dev*, 2007: 2525-38.
- Seemann, Maurici, Olivier, Fromentel, Hainaut. „The Tumor Suppressor Gene TP53: Implications for Cancer Management and Therapy.“ *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2008: 551-583.
- Sefrioui, Sarafan-Vasseur, Beaussire, Barette, Gangloff, Blanchard, Clatot, Sabourin, Sesboüé, Frebourg, Michel, Di Fiore. „Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer.“ *Dig Liver Dis*, 2015: 884-90.
- Senda, Shimomura, Iizuka-Kogo. „Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene.“ *Anat Sci Int*, 2005: 121-31.
- Schmidt, Diehl, Choti et al. „Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics.“ *Nat Med*, 2008: 985–990.
- Spindler, Pallisgaard, Andersen, Brandslund, Jakobsen. „Circulating Free DNA as Biomarker and Source for Mutation Detection in Metastatic Colorectal Cancer.“ *PLoS ONE*, 2015: e0108247.
- Stroun, Lyautey, Lederrey, Olson-Sand, Anker. „About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release.“ *Clin Chim Acta*, 2001: 139-142.

- Sun, Wu, Guan. „Colonography by CT, MRI and PET/CT combined with conventional colonoscopy in colorectal cancer screening and staging.“ *World J. Gastroenterol*, 2008: 853-863.
- Taly, Pekin, Benhaim, Kotsopoulos, Le Corre, Li, Atochin, Link, Griffiths, Pallier, Blons, Bouché, Landi, Hutchison, Laurent-Puig. „Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients.“ *Clin Chem*, 2013: 1722-31.
- Taniguchi, Uchida, Nishino, Kumagai, Okuyama, Okami, Higashiyama, Kodama, Imamura, Kato. „Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas.“ *Clin. Cancer Res*, 2011: 7808–7815.
- Taylor, Burt, Williams, Haug, Cannon-Albright. „Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach.“ *Gastroenterology*, 2010: 877-85.
- Thierry, El Messaoudi, Mollevi, Raoul, Guimbaud, Pezet et al. „Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment.“ *AnnOncol*, 2017: 2149-59.
- Tie, Semira, Gibbs. „Circulating tumor DNA as a biomarker to guide therapy in post-operative locally advanced rectal cancer: the best option?“ *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2017: 1-3.
- Torre, Bray, Siegel, Ferlay, Lortet-Tieulent, Jemal. „Global cancer statistics, 2012.“ *A Cancer Journal for Clinicians*, 2015: 87–108.
- Umetani, Kim, Hiramatsu, Reber, Hines, Bilchik, Hoon. „Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: Direct quantitative PCR for ALU repeats.“ *Clin Chem*, 2006: 1062-1069.
- Vatandoust, Price, Karapetis. „Colorectal cancer: Metastases to a single organ.“ *World Journal of Gastroenterology*, 2015: 11767-11776.
- Vogelius, Spindler, Pallisgaard, Jakobsen. „Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan.“ *Clin Cancer Res*, 2012: 1177-85.
- Vukobrat-Bijedic, Husic-Selimovic, Sofic, Bijedic, Bjelogrljic, Gogov, Mehmedovic. „Cancer antigens (CEA and CA 19-9) as markers of advanced stage of colorectal carcinoma.“ *Med. Arch*, 2013: 397-401.
- Wang, Hsieh, Chang et. al. „Molecular Detection of APC, K-ras, and p53 Mutations in the Serum of Colorectal Cancer Patients as Circulating Biomarkers.“ *World Journal of Surgery*, 2004: 721.
- Warton, Graham, Yuwono, Samimi. „Comparison of 4 commercial kits for the extraction of circulating DNA from plasma.“ *Cancer Genet*, 2018: S2210-7762(17)30267-3.
- Williams, Diaz, Wu, Kinde, Hecht, Berlin et al. „The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade colorectal cancers.“ *Nature*, 2012: 537-40.
- Winawer, Zauber, Ho, O'Brien, Gottlieb, Sternberg, Waye, Schapiro, Bond, Panish, Ackroyd, Shike, Kurtz, Hornsby-Lewis, Gerdes. „Prevention of Colorectal Cancer by Colonoscopic Polypectomy.“ *N Engl J Med*, 1993: 1977-1981.

- Wu, Kinde, Papadopoulos et al. „Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011: 9530-5.
- Yi, Ma, Guan, Chen, Yang, Xia. „The feasibility of using mutation detection in ctDNA to assess tumor dynamics.“ *International Journal of Cancer*, 2017: 2642–2647.
- Yonesaka, Zejnullahu, Okamoto, Satoh, Cappuzzo, Souglakos et al. „Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab.“ *Sci Transl Med*, 2011: 99ra86.
- Zhang, Xu, Shao et al. „Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation.“ *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015: 1383-1388.
- Zheng, Ye, Sun, Wang, Ni, Zhang HP, Zhang L, Luo, Zhang J et al. „Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance.“ *Sci. Rep*, 2016: 20913.
- Zhou, Chang, Guan, Yang, Xia, Cui et al. „Application of Circulating Tumor DNA as a Non-Invasive Tool for Monitoring the Progression of Colorectal Cancer.“ *PLoS ONE*, 2016: 11(7):e0159708.
- Zonta, Garlan, Pecuchet, Perez-Toralla, Caen, Milbury, Didelot, Fabre, Blons, Laurent-Puig et al. „Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations.“ *PLoS ONE*, 2016: 11:e0159094.

Internetové zdroje:

DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUDÍK Jan, VYZULA Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2018-3-29]. Dostupný z

WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.

SOLEN MEDICAL EDUCATION, Onkologie [online]. Klasifikace kolorektálního karcinomu [7/2013]. [cit. 2018-4-29]. Dostupný z

WWW: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2013/04/03.pdf>

COSMIC - CATALOGUE OF SOMATIC MUTATIONS IN CANCER [online]. Cancer browser, [cit. 2018-1-12]. Dostupný z

WWW:http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?wgs=off&sn=large_intestine&ss=all&hn=carcinoma&sh=adenocarcinoma&in=t&src=tissue&all_data=n

COSMIC - CATALOGUE OF SOMATIC MUTATIONS IN CANCER [online].

Gene view, [cit. 2018-14-4]. Dostupný z

WWW:http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?coords=AA%3AAA&sn=large_intestine&wgs=off&preset-sn=large_intestine&preset-hn=carcinoma&preset-sh=adenocarcinoma&id=923&ln=APC&start=815&end=2844

NCBI - National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [online].

Gene, [cit. 2018-4-29]. Dostupný z

WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5290>